

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

ACCESSION NUMBER: 1997:436143 CAPLUS
DOCUMENT NUMBER: 127:47064
TITLE: Preparation of human telomerase for diagnosis
of tumors
INVENTOR(S): Murofushi, Kimiko
PATENT ASSIGNEE(S): Soosei K. K., Japan
SOURCE: Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 5 pp.
CODEN: JKXXAF

	NUMBER	DATE
PATENT INFORMATION:	JP 09154575 A2	970617 Heisei
APPLICATION INFORMATION:	JP 96-282948	961004
PRIORITY APPLN. INFO.:	JP 95-284559	951004
DOCUMENT TYPE:	Patent	
LANGUAGE:	Japanese	

AB Telomerase useful in the diagnosis of tumors is prepd. from the
Namalwa cell homogenate. After a few steps of chromatog., the
enzyme was purified with the (TTAGGG)₂-contg. affinity chromatog.
The enzyme exhibits a mol. wt. 300 kDa by gel filtration. The
enzyme is predicted by SDS-PAGE (reducing) to contains a 140-, an
80-, and a 50-kDa components.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-154575

(43) 公開日 平成9年(1997)6月17日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/88			C 1 2 N 9/88	
C 0 7 K 14/47			C 0 7 K 14/47	
// A 6 1 K 38/51	ADU		C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 H 21/04		7823-4B	C 1 2 Q 1/527	
C 1 2 Q 1/527		7823-4B	1/68	A
審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 5 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-282948

(22) 出願日 平成8年(1996)10月4日

(31) 優先権主張番号 特願平7-284559

(32) 優先日 平7(1995)10月4日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 392033288

株式会社そーせい

東京都文京区後楽1丁目1番10号

(72) 発明者 室伏 きみ子

埼玉県浦和市辻4-12-17

(74) 代理人 弁理士 廣瀬 孝美

(54) 【発明の名称】 テロメラーゼ

(57) 【要約】

【課題】 ヒトテロメラーゼを提供する。

【解決手段】 本発明は、ヒト染色体末端部分テロメア DNA 部分の 3' 末端をプライマーにして、繰り返し配列の一本鎖を延長する活性を有する酵素 (テロメラーゼ) に関する。本発明のテロメラーゼは、癌に対する診断薬などの開発に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質及び生理活性を有するRNA蛋白質であることを特徴とするヒトテロメラーゼ。

- ①ゲル濾過法による推定分子量が約300kである、
- ②SDS-PAGE（還元条件下）による推定分子量が、少なくとも約140k、80k及び50kの構成蛋白からなる会合体である、
- ③ヒト染色体末端部分テロメアDNA部分の3'末端をプライマーにして、繰り返し配列の一本鎖を延長する活性を有する。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はテロメラーゼ(Telomerase)に関し、より詳細にはヒトテロメアDNA部分の3'末端をプライマーにして、繰り返し配列の一本鎖を延長する活性を有する蛋白質に関する。

【0002】

【従来の技術】真核生物の染色体DNAは直鎖状二本鎖からなる。一本の染色体はひとつづきの二本鎖DNAを含むと考えられ、染色体末端部分はテロメアと称され、染色体の安定化などに必要な特殊な構造をとっており、DNAからなる末端テロメアDNAがある。テロメアDNAは短い繰返し配列からなり、哺乳類では5' TTAGGG 3'の6塩基が数百回繰返しして10kbもの長さになっている。直鎖状DNAが複製する際に、リーディング鎖もラギング鎖も一番端の5'末端のRNAプライマーはDNAで置き換えることができないので、通常の複製機構では複製のつど、少なくともプライマー分だけは短縮せざるを得ない。実際、ヒトの体細胞を培養して継代を続けるとテロメアDNAが短縮する。個体レベルでも、年齢の高いヒトの細胞ほどテロメアDNAが短いことがわかった。DNA型癌ウイルスでトランスフォームした細胞は、正常細胞の分裂寿命の限界を超えて増殖を継続することができるが、テロメアDNAは短縮し続け、限界にまで短縮すると染色体の安定性が保てなくなり、細胞は死滅する。このことは、ヒト体細胞には細胞分裂回数（複製回数）に絶対的な限界があることを意味している。

【0003】一方、単細胞の原生動物や酵母では、増殖を繰り返してもテロメアDNAは短縮しない。テロメアDNA部分の3'末端をプライマーにして、繰返し配列の一本鎖を延長するテロメラーゼという酵素があるからである。テロメラーゼは鋳型RNAをもったRNA酵素であり、一種の逆転写酵素である。6塩基ずつを一つの単位として延長する。原生動物の絨毛虫類では鋳型RNAの塩基配列が報告されていたが、ヒトでも最近明らかになりつつある。

【0004】従来、テロメラーゼ酵素活性の測定は非常に感度が低く、テロメラーゼ活性を発現している10⁷

個の細胞抽出液と30μCiの放射性ヌクレオチドを用いて分析し、反応産物を電気泳動した後、3日から1週間も露光してようやく検出できる程度であった。しかし、反応産物をPCRで増幅することによって著しく高感度に検出する方法（TRAP法）が開発されつつある。これによって、各種の細胞・組織でのアッセイが容易になり、酵素精製への道が開け、酵素阻害剤スクリーニングも現実のものとなってきている。

【0005】生殖細胞が増殖するたびにテロメアDNAが短縮したのでは種が絶滅する。ヒトの生殖細胞・精子は年齢によらずテロメアDNAの長さは一定である（12～15kb）。最近、上述したテロメラーゼ活性測定法の改良に伴い、睾丸、卵巣にはテロメラーゼ活性があることがわかった。受精卵から初期発生段階の細胞にはテロメラーゼがあつて、細胞分裂を繰り返してもテロメアDNAは短縮しないと考えられる。将来生殖細胞になる細胞群では、このままテロメラーゼが発現し続けるのに対し、体細胞に分化する細胞群ではどこかの時点でテロメラーゼの発現を抑制するスイッチが入るものと考えられる。テロメアDNAは、間期の細胞では核膜周辺にあり、染色体を形成すると末端に位置する。テロメアDNAそのものには蛋白質をコードする遺伝子は存在しないが、染色体を安定に保つためには不可欠で、これを欠く染色体DNA末端は分解あるいは融合しやすい。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】ところで、齧歯類の初代培養細胞が癌化するには、癌らしい表現型を与える癌遺伝子（例えば、ras）の働きと、不死化を与える癌遺伝子（例えば、myc）の両方が必要であることが確立している。一方、ヒトの癌組織の細胞が不死化しているかどうかは疑いがもたれていたが、前述のTRAP法によって、ヒト癌組織にも多くの場合テロメラーゼ活性があることがわかった。これまでに知られている癌に伴う遺伝子発現変化のなかでは最も相関性の高いものである。これに対して、ほとんどの正常細胞はテロメラーゼ活性がないか、例外的にあつても極めて弱い。従って、テロメラーゼは癌に対する診断薬として、またテロメラーゼの阻害剤は癌に対する治療剤として利用できると推察される。しかしながら、ヒトテロメラーゼを単離・精製した例は知られていない。本発明者は、以前より上記のヒトテロメラーゼにつき、鋭意研究を重ねてきたが、その本体を単離し精製することに初めて成功した。本発明はかかる知見に基づいてなされもので、本発明は癌の診断薬、治療剤などの開発に有用なヒトテロメラーゼを提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は前記課題を解決するためになされたものであり、その要旨は、下記の理化学的性質及び生理活性を有するRNA蛋白質であることを特徴とするヒトテロメラーゼである。

- ①ゲル濾過法による推定分子量が約300kである、
 ②SDS-PAGE（還元条件下）による推定分子量が、少なくとも約140k、80k及び50kの構成蛋白からなる会合体である、
 ③ヒト染色体末端部分テロメアDNA部分の3'末端をプライマーにして、繰り返し配列の一本鎖を延長する活性を有する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明のテロメラーゼはヒト癌細胞が産生（発現）しており、当該細胞、特にヒト白血病細胞より効率よく、しかも高収率で単離することができる。ここで、原料として用いられるヒト白血病細胞（ナマルバ細胞）は、テロメラーゼ単離を目的として、当該酵素の高生産株（他株より10倍量の生産性）をクローン化したものである。また、癌細胞の他に、本発明のテロメラーゼは血液幹細胞及び生殖細胞でも発現しており、これらの細胞からも本発明のテロメラーゼを得ることができる。

【0009】本発明のテロメラーゼは上記の原料から得ることができる。上記の原料からの本発明のテロメラーゼの製造は、基本的にはこの種の生体物質からの蛋白質性物質の分離に汎用される通常の方法と同様にして、目的とするテロメラーゼの物理的、化学的性質を利用した各種の処理操作に従い実施することができる。当該処理操作としては、例えば、遠心分離、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、透析法などが挙げられ、必要に応じてこれらの方法を適宜組み合わせることで実施できる。特に、本発明者の研究によれば、本発明のテロメラーゼは、セファロースCL-6B、DEAE-セファデックス、ヘパリン-アフィニティ、ヒドロキシアパタイト、フェニルセファロース、スペルミンアガロース及びTTAGGGTTAGGG-アフィニティなどのクロマトグラフィーによる精製が最適である。

【0010】特に好ましい精製法の一例としては、まず本発明のテロメラーゼを産生又は含有している原料、例えば、ナマルバ細胞をホモジナイズした後、抽出緩衝液で抽出し、15万gで遠心後、その上清をS150画分として得る。活性物質を含有する当該上清を、DEAE等の陰イオン交換体を使用するイオン交換クロマトグラ

フィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、ヘパリン-セファロースクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、TTAGGGTTAGGG-アフィニティクロマトグラフィー、スペルミンアガロースクロマトグラフィー及びゲル濾過に順次かけて精製することにより本発明のテロメラーゼを得ることができる。上記の各処理の操作、条件は、通常のこの種の方法におけるそれらと同様のものとして行うことができる。上記の方法により、本発明のテロメラーゼが単離・精製され、これは前記の特性にて特定される。なお、本発明のテロメラーゼは上記の例で調製されたものに限定されるものではない。分離・精製の操作、条件などは適宜変更して実施することができる。更に、前記の理化学的性質及び生理活性を有する限り、如何なる原料、由来、製法、条件により調製されたものでも本発明に包含される。

【0011】

【発明の効果】前述のように、組織や細胞のテロメラーゼ活性は、癌化に伴う遺伝子発現変化のなかでは最も相関性の高いものであり、テロメラーゼ活性の測定は前癌状態や癌の診断に有用である。本発明のテロメラーゼは、かかるテロメラーゼ活性測定の標準品として利用できる。また当該テロメラーゼの抗体を調製することによりテロメラーゼを免疫学的方法にて高感度で測定することができるので、本発明のテロメラーゼは上記抗体を調製する際の抗原として有用である。更に、本発明のテロメラーゼに対する阻害剤あるいは当該テロメラーゼのmRNAに対するアンチセンスは癌に対する治療薬としても有用である。従って、本発明のテロメラーゼは、癌に対する診断薬、治療剤などの開発、研究に有用である。

【0012】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなら限定されるものではない。なお、実施例におけるカラム溶出液のテロメラーゼ活性の測定は下記の方法にて行なった。

テロメラーゼ活性測定方法

テロメラーゼ活性の測定は、Kimらの方法(Science 266, 2011-2015, 1994)を改変した下記のTRAP法(PCR法)にて行なった。まず、下記の組成からなる反応液（最終40μl）を調製した。

20mM トリス-塩酸 (pH8.3)
 1.5mM MgCl₂
 60mM KCl
 0.005% Tween 20
 1mM EGTA
 それぞれ50μMのdATP, dGTP, TTP, dCTP
 0.1μg TSオリゴヌクレオチド(5' AATCCGTCGAGCAGAGTT3')
 1μg T₄ gene S32 protein
 0.1mg/ml BSA (ヌクレアーゼフリー)

4 μ Ci [α -³²P] dCTP

試験サンプル

上記の反応液を23℃で20分間インキュベートし、更に94℃で2分間インキュベートした。次いで、0.1 μ gのCXプライマー(5' CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA3')を加え、直ちに72℃にて2 U Taqポリメラーゼを加えて混合後、1ドロップのミネラル油を加え、PCR法(94℃ 30秒, 50℃ 30秒, 72℃ 60秒)により増幅させた(27サイクル)。94℃で5分間インキュベートした後、氷中で冷却し、試料を電気泳動(10% ポリアクリルアミドゲル, 20mA, 1.5時間)に付し、ゲルを乾燥後、フィルムに一夜感光させた。

【0013】実施例1

テロメラーゼの単離・精製

ナマルバ細胞(テロメラーゼ高産生株)を10% FCS 添加RPMI-1640培地で培養後、リン酸緩衝食塩水で洗浄した。抽出緩衝液(10mM HEPES, pH8.0, 3mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM PMSF, 10U/ml PNASin)で1回すすいで、氷中に10分間置いた。細胞をホモジナイズした後、氷中に30分間置き、遠心(40,000xg, 10分間)し、1/50量の5M NaClを加え、60分間遠心した(150,000xg)。上清を、0.15M NaClを含む緩衝液A(20mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM 2ME, 1mM MgCl₂, 10% グリセロール)で平衡化したDEAE-セファロース(DEAE-Sepharose)カラムにかけ、0.15-0.8M NaCl/緩衝液Aで溶出した。活性画分(0.4-0.5M NaCl)を集め、50mMのNaClを含む緩衝液Aに対して透析した後、緩衝液Aで平衡化したヘパリン-セファロース(Heparin-Sepharose)カラムにかけ、0.05-0.1M NaCl/緩衝液Aで溶出した。活性画分(0.25-0.4M NaCl)を集め、緩衝液B(20mM リン酸カリウム, pH7.0, 1mM MgCl₂, 5mM 2ME)に対して透析した後、緩

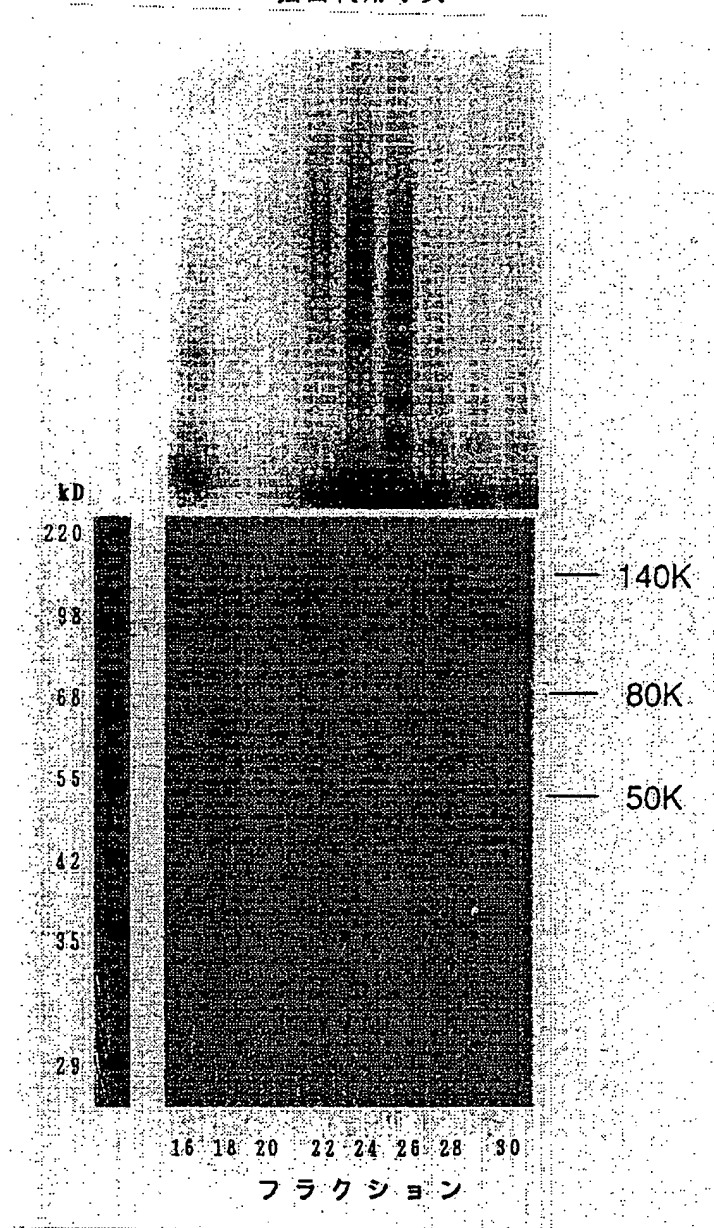
衝液Bで平衡化したヒドロキシアパタイトカラムにかけ、0.02-0.6M リン酸カリウム/緩衝液Bで溶出した。活性画分(0.25-0.8M)を集め、緩衝液C(50mM Tris-酢酸, pH8.2, 5mM 2ME, 3.5mM MgCl₂, 1mM spermidine, 2.5mM EGTA, 20mM KCl, 25mM NaCl)に対して透析した。試料に、2mM dATP, 2mM TTP, 2 μ g/0.1ml T₄ gene S32 proteinとなるようにそれぞれを添加し、(TTAGGG)₂を結合させたアフィニティカラム(同じ緩衝液で平衡化)にかけてインキュベート後、0-0.1M NaClで溶出させた。カラムに弱く結合している活性画分(NaClの濃度勾配をかけると直ちに溶出されてくる)を集め、濃縮後、0.1M NaClを含む緩衝液Aに対して透析した。セファロース CL-6Bによるゲル濾過を行ない、約300kに相当する部分に溶出されてくる画分(フラクション22~26)を集め、濃縮することにより、本発明のテロメラーゼを得た。各フラクションをSDS-PAGE(還元条件下)で分析した結果を図1(下方)に示す(左側のレーンは分子量マーカーであり、29k、35k、42k、55k、68k、98k及び220kの標準蛋白質を用いた)。なお、図1の上方は、前述の方法で測定した各フラクションのテロメラーゼ活性を示す。図1に示されるように、テロメラーゼ活性はフラクション22~26に認められ、当該フラクションはSDS-PAGE(還元条件下)で少なくとも約140k、80k及び50kのバンドからなることが確認された。

【図面の簡単な説明】

【図1】ゲル濾過法により精製された本発明の酵素のテロメラーゼ活性及び電気泳動の結果を示す写真である。

【図1】

図面代用写真



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

C 1 2 Q 1/68

識別記号

庁内整理番号

F I

A 6 1 K 37/56

技術表示箇所

ADU